

LDH 参与的机械-光信号转换体系的吸收光谱研究

蒋本国, 张 乐, 范圣第

大连民族学院生物技术与资源利用国家民委教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600

摘 要 用紫外-可见分光光度法研究了乳酸脱氢酶(LDH)参与的, 以 NADH 与 DPIP, O_2 为主体的机械-光信号振荡转换体系。LDH 的酶催化作用使此振荡体系的信号转换效率大大提高, 在无乳酸情况下, 当 DPIP 和 NADH 的摩尔比为 1 : 4.5 时的平均循环周期由 108 min 缩短为 34 min; 在乳酸存在下, 此体系的平均循环周期由 108 min 缩短为 29 min。推测 LDH 的促进作用主要是通过对 NADH 的活化实现的, 其次是通过酶促乳酸脱氢作用补充体系中的 NADH 获得的。结果说明, 酶的催化作用在某些双底物之一存在的反应情况下, 也会明显表现出来。

关键词 乳酸脱氢酶; NADH; DPIP; 信号振荡

中图分类号: Q554 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2008)03-0609-03

引 言

不同的信号转换方式^[1]以及信号识别方式^[2]是人工模拟细胞信号转导体系构建研究的重要内容^[3], 同时大幅提高信号转换效率也是问题的关键^[4]。Ottoisson 报道的通过机械振荡引发化学振荡反应, 再引起颜色振荡的新型反应体系^[5], 是一个比较有意义的将机械振荡信号通过化学反应转换为光信号的信号转换过程^[6], 其特点是通过 2,6-二氯酚吲哚酚钠氧化态(DPIP_{OX})到还原态(DPIP_{RED})的变化, 使体系获得了由蓝色到无色的可视信号变化。本文将这个信号转换体系与酶促反应相结合, 引入乳酸脱氢酶(LDH)的酶促作用来提高这个振荡转换体系的信号转换效率。由于酶活性的可调节性质, 通过进一步研究采用不同的调节剂^[7]可使整个信号转换体系的功能性更为丰富, 并根据不同的需要得到合理的调控, 使信号振荡体系达到特定的使用目的。选择 LDH 参与振荡体系研究的理由主要是, 近年来 LDH 在模拟细胞信号转导体系的研究中占有突出的地位^[8], 对 LDH 的许多生化性质了解比较深入^[9], 另外, LDH 可以通过 β -尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)这一重要辅酶与机械振荡体系相关联^[10]。显然, NADH 还原 DPIP_{OX}生成 DPIP_{RED}的反应中, 自身被氧化为 NAD⁺, 体系中 NADH 的减少与 NAD⁺ 的增多对信号转换的过程产生不利影响。通过 LDH 催化乳酸的脱氢作用将 NAD⁺ 再转化为 NADH, 有利于信号转换体系的高效、稳定与持久。

如果换一个角度来考察上述信号转换振荡体系, 也可以认为是在 LDH 催化的乳酸脱氢反应中引入 DPIP 信号振荡体系, 利用 DPIP 信号振荡体系中机械振荡转换为化学振荡的过程作为调控手段, 控制 LDH 的酶促反应过程^[11], 近似起到人工模拟细胞信号转导中的往复“开”“关”的作用^[12]。起始体系中 DPIP_{OX}(蓝色)浓度为最大值, 其氧化 NADH 生成 NAD⁺, NAD⁺ 在 LDH 的催化下使乳酸脱氢, 体系为“开”的状态, 当 DPIP_{OX} 完全被 NADH 还原为 DPIP_{RED}(无色), 此时无新的 NAD⁺ 生成, 乳酸的脱氢作用停止, 体系为“关”的状态, 然后由机械振荡过程在体系中引入 O_2 , O_2 使体系中积累的 DPIP_{RED}(无色)氧化为 DPIP_{OX}(蓝色), DPIP_{OX} 再氧化 NADH 生成 NAD⁺, 由 NAD⁺ 在 LDH 催化下使乳酸脱氢, 至此体系状态又为“开”的状态, 如此周而复始, 持续循环下去。体系的外来信号是 O_2 , O_2 引起酶促反应的进行, 随后体系自行消除了 O_2 信号的作用回到酶促反应终止状态。体系进行的状态采用紫外-可见分光光度法测定^[13]。

本文重点是引入 LDH 对 DPIP 信号转换振荡体系的促进作用进行研究这一个方面。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

NADH, DPIP, 乳酸脱氢酶(LDH), 乳酸, 均为 Sigma 公司产品; 紫外-可见分光光度计; Lambda 25, PE 公司; pH 计, PHB-3, 上海三信仪器厂。

收稿日期: 2006-10-19, 修订日期: 2007-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(20472013)资助

作者简介: 蒋本国, 1954 年生, 大连民族学院生物工程系副教授

e-mail: jbg@dlnu.edu.cn

1.2 实验方法

根据 LDH 最适条件^[14]选择 pH 为 8.9 的 Tris-HCl 缓冲液 4 mL 溶解不同比例(摩尔比)的 DPIP_· 和 NADH, 将此溶液加入到 10 mm×10 mm 石英比色皿中, 加到 3/4 位置, 上端以封口膜封住, 在 25 °C 恒温进行反应(见表 1), 溶液初始为蓝色, 随着反应的进行, 蓝色逐渐消退, 当蓝色基本消退后, 将比色皿倒转数次, 使空气中的 O₂ 进入溶液使 DPIP_{RED} 氧化为 DPIP_{OX}, 体系重又变成蓝色。反应过程中反应液在 615 nm 测定吸光度, 见图 1。

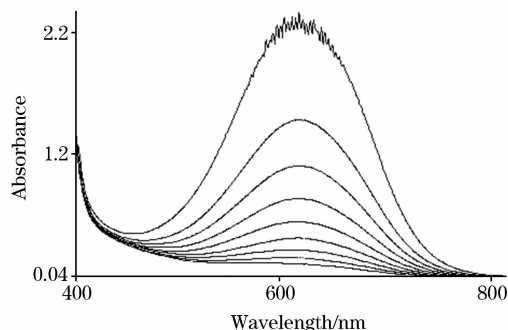


Fig. 1 Spectrums of NADH : DPIP_· signal transduction system (blue from deep to shallow)

加入 LDH 时, 取 100 μL 酶液(分别含 LDH 2, 4, 6, 8 u), 加入到 3.9 mL pH 为 8.9 的 Tris-HCl 缓冲液中, 溶解摩尔比为 1 : 4.5 的 DPIP_· 和 NADH 在 25 °C 恒温进行反应与测定, 以确定后续研究用 LDH 量。

最后加入 100 μL (8 u) 酶液, 再加入每 mL 含有乳酸 10 mg 的 3.9 mL pH 为 8.9 的 Tris-HCl 缓冲液中, 溶解摩尔比为 1 : 4.5 的 DPIP_· 和 NADH 在 25 °C 恒温进行反应与测定。使用乳酸选择了大大过量, 故未对乳酸的用量对体系的影响进行研究。

2 结果与讨论

2.1 DPIP_· 和 NADH 基础振荡体系的研究

按表 1 进行 DPIP_· 和 NADH 基本振荡体系的研究, DPIP_· : NADH 的比例为 1 : 3 的体系从蓝色放置至无色的时间在 24 h 左右, 时间过长, 研究不便。而比例为 1 : 7.5 的体系放置的时间较短, 也不适于作为进一步引入 LDH 进行研究的参考体系。比例为 1 : 4.5 的振荡体系, 平均振荡周期为 108 min, 具有较大的缩短振荡周期的空间, 以此为对照基础研究酶对振荡体系的促进作用。

Table 1 Signal transduction period with different ratio(mol) of DPIP_· : NADH

| DPIP _· : NADH 比例/mol | 1 : 3 | 1 : 4.5 | 1 : 6 | 1 : 7.5 |
|---------------------------------|-------|---------|--------|---------|
| DPIP _{OX} /mg | 3 | 3 | 3 | 3 |
| NADH/mg | 21 | 32 | 42 | 53 |
| 周期 | ≈24 h | 108 min | 32 min | 24 min |

2.2 LDH 参与的振荡体系研究

对 DPIP_· : NADH 的比例为 1 : 4.5 的振荡体系借助于 LDH 的酶催化作用, 促进 DPIP_· 和 NADH 基本振荡反应过程, 见图 2, LDH 的引入大幅度缩短了信号转换的周期, 随着 LDH 酶浓度的增加, 体系振荡周期缩短的幅度逐渐减小。在体系中加入 8 u (100 μL) 酶液时, 体系振荡周期由平均 108 min 缩短为 34 min, 大幅度提高了体系的信号转换效率, 见图 2。

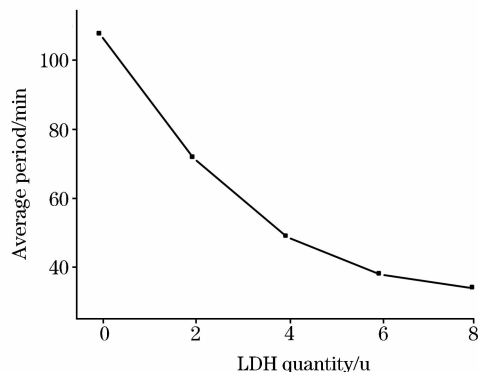


Fig. 2 Influence of the amount of LDH to the signal transduction period

根据酶的催化反应的一般机制, NADH 作为辅酶通过结合在 LDH 的活性中心上而使 NADH 处于高度活化状态^[15], 其对 DPIP_{OX} 的还原活性明显提高。尽管 DPIP_{OX} 不是 LDH 的合适底物, DPIP_{OX} 仍可以与经 LDH 活化的 NADH 顺利发生反应, 从而使信号转换的速度明显加快, 结果使振荡体系的振荡周期显著缩短。这种在特定反应中只有部分反应物是酶的底物, 另一部分反应物不是酶的底物, 酶对这种反应过程的催化作用可以称作半酶促作用。

因此, DPIP_{OX} 的还原进程应由两部分反应构成, 即 LDH 参与的 NADH 对 DPIP_{OX} 还原过程, 以及非酶参与的 NADH 对 DPIP_{OX} 还原过程。从实验结果看, 由于 LDH 数倍提高了体系的信号转换效率, 因此 LDH 对 NADH 的活化作用是使信号转换效率大大提高的主导因素。

2.3 LDH 及乳酸参与的振荡体系研究

在 LDH 存在的基础上, 加入乳酸, 是希望通过乳酸的脱氢作用来弥补 NADH 的不断消耗, 通过 LDH 的多重作用来提高信号转换的效率。在 DPIP_· : NADH 的比例为 1 : 4.5 的振荡体系中, 加入乳酸后的振荡体系, 平均信号转换周期由 34 min 缩短为 29 min, 是比较可观的。在此, LDH 的作用体现在两个方面, 其一是 LDH 对 NADH 的活化作用, 其二是 LDH 对乳酸的脱氢作用, 使体系的 NADH 浓度得到补充与提高。乳酸的存在可能并不仅仅是通过脱氢作用来弥补 NADH 的消耗发挥作用, 但是尚未见到相应的实验事实。

3 结论

(1) LDH 参与 DPIP_· 和 NADH 构成的信号振荡体系, 对体系的信号转换效率具有突出的促进作用。

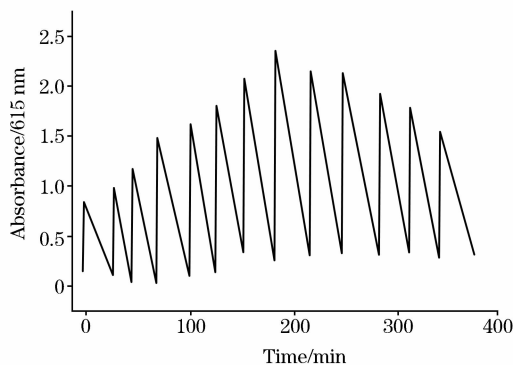


Fig. 3 Signal Transduction period of the system of DPIP. : NADH(mol ratio) = 1 : 4.5 with participation of LDH and lactate at 615 nm

(2)加入 LDH 后, DPIP. 和 NADH 的摩尔比为 1 : 4.5 的振荡体系的循环平均周期由原来的 108 min 缩短为 34 min。

(3)加入 LDH 及乳酸后, DPIP. 和 NADH 的摩尔比为 1 : 4.5 的振荡体系的循环平均周期由原来的 108 min 缩短为 29 min(见图 3)。

(4)双底物反应及多底物反应的相关酶对底物之一参与的其他反应也可能具有明显的催化作用。

研究表明 LDH 对整个振荡体系的促进主要来自两个方面, 其一是 LDH 催化了 NADH 对 DPIP_{ox} 的还原作用, 使振荡循环周期大大缩短; 其二是 LDH 可以通过乳酸的脱氢作用使 NAD⁺ 生成 NADH, 使体系中的 NADH 浓度得到稳定, 不仅可以进一步提高信号转换效率, 还可以延长振荡体系的寿命。

参 考 文 献

- [1] Butcher E C, Berg E L, Kunkel E J. *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22: 1253.
- [2] Jun-ichi Kikuchi, Katsuhiko Ariga, Yoshihiro Sasaki, et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 11(4-6): 977.
- [3] Jun-ichi Kikuchi, Katsuhiko Ariga, Yoshihiro Sasaki. *Advances in Supramolecular Chemistry*, 2002, 8: 131.
- [4] Sada K, Shiomi N, Miyata M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120: 10543.
- [5] Jenny E A Ottosson, Bakul C Dave. *Sensors and Actuators*, 2004, B97: 198.
- [6] Tariq M Rana, Claude F. Mearest. *Proc. Nail. Acad. Sci. USA*, 1991, 88: 10578.
- [7] Sebastián Cerdán, Tiago B. Rodrigues, Alejandra Sierra, et al. *Neurochemistry International*, 2006, 48(6-7): 523.
- [8] Kentaro Fukuda, Yoshihiro Sasaki, Katsuhiko Ariga, et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 11(4-6): 971.
- [9] Tian Wen-Jie, Yoshihiro Sasaki, Fan Sheng-Di, et al. *Supramolecular Chemistry*, 2005, 17: 113.
- [10] Koichi Tanaka, Masaaki Honda, Toshikazu Takabatake. *Journal of the American College of Cardiology*, 2001, 37(2): 676.
- [11] Yeong-Gon Choi, Eun-jin Bae, Dong-Seok Kim, et al. *Journal of Dermatological Science*, 2006, 43(3): 181.
- [12] Roseata Zonouzi, Saeid Kazemi Ashtiani, Saman Hosseinkhani, et al. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 39(4): 426.
- [13] JIANG Chun-ming, ZHANG Han-chang, LIN Xiang-qin, et al(姜春明, 张汉昌, 林祥钦, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 125(15): 751.
- [14] James L Thomas, Ian Mason J, Stacey Brandt, et al. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(45): 42795.
- [15] Murray J D. *Math. Biol.*, 1993, 19: 116.

The Spectrum Studies of Mechano-Optical Signal Transduction with Participation of LDH

JIANG Ben-guo, ZHANG Le, FAN Sheng-di

Dalian Nationalities University, Key Lab of Biotechnology and Bioresources Utilization, SEAC-ME, Dalian 116600, China

Abstract The optical response from a mechanical stimulus signal oscillating system of NADH, DPIP and O₂ with the participant of lactate dehydrogenase (LDH) was studied with UV/Vis Spectrometer in the present paper. The signal transduction efficiency of the system was largely improved by the catalysis of LDH, when DPIP. : NADH was 1 : 4.5 (mole ratio) without lactate, and the average period of system was shortened from 108 to 34 min, and to 29 min with lactate existing. It was presumed that the accelerating effect of LDH was mainly brought by the activation of NADH at its catalysis center, and in addition, brought by the supplement of NADH through the dehydrogenation of lactate. The results indicated that the catalysis of enzyme would be put up also when only one of the two substrates existed.

Keywords Lactate dehydrogenase; NADH; DPIP.; Signal transduction

(Received Oct. 19, 2006; accepted Jan. 22, 2007)